

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-324507

(43)Date of publication of application : 22.11.2001

---

(51)Int.Cl.

G01N 33/545

---

(21)Application number : 2000-146391

(71)Applicant : NANO CAREER KK

(22)Date of filing : 18.05.2000

(72)Inventor : NAGASAKI YUKIO

RA RAIHIN

MOTOSAWA EIICHI

KATAOKA KAZUNORI

---

(54) COMPOSITION MEASURING IMMUNITY CONTAINING IMMUNONANOSPHERE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a composition for immunoassay of antigen or antibody.

SOLUTION: This composition for immunoassay contains immunonanosphere composed of high molecular micelle and having a structure which is composed of hydrophilic homopolymer or hydrophilic-hydrophobic block copolymer and in which a core of the high molecular micelle is hardened due to addition polymerization of ethylene unsaturated double bond capable of polymerizing  $\omega$ -terminal of the polymer and hydrophobic monomer.

---

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号  
特開2001-324507  
(P2001-324507A)

(43)公開日 平成13年11月22日(2001.11.22)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>  
G 0 1 N 33/545

識別記号

F I  
C 0 1 N 33/545

データベース(参考)  
Z

審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 6 頁)

(21)出願番号 特願2000-146391(P2000-146391)

(22)出願日 平成12年5月18日(2000.5.18)

(71)出願人 597144679

ナノキャリア株式会社  
千葉県柏市柏の葉5丁目4番地6

(72)発明者 長崎 幸夫

茨城県北相馬郡守谷町けやき台3-5-17

(72)発明者 羅 来斌

千葉県野田市山崎2641 東京理科大学基礎  
工学部材料工学科内

(72)発明者 本澤 栄一

茨城県稲敷郡笠崎町若葉1-14 ドリーム  
若葉3-101

(74)代理人 100060782

弁理士 小田島 平吉 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 イムノナノスフェア-を含有する免疫測定用組成物

(57)【要約】

【課題】 抗原または抗体のイムノアッセイ用組成物の提供。

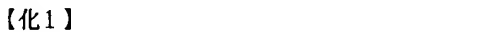
【解決手段】 高分子ミセルからなるイムノナノスフェア-であって、親水性ホモポリマーまたは親-疎水性ブロックコポリマーからなり、かつ高分子ミセルのコアが、該ポリマーの $\omega$ -末端の重合可能なエチレン性不飽和二重結合と疎水性モノマーとの付加重合によって固化した構造を有するイムノナノスフェア-を含むイムノアッセイ用組成物。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 生物学的試料中に存在する抗原または抗体を検出することのできるイムノナノスフェアを含んでなるイムノアッセイ用組成物であって、イムノナノスフェアがコア-シェル型高分子ミセルであり、該高分子ミセルが親水性ホモポリマーまたは親-疎水性ブロックコポリマーに由来し、かつ、該ポリマーが片末端（ $\alpha$ -末端）または親水性ブロック末端（ $\alpha$ -末端）に共有結合した抗体または抗原を有し、そしてもう一方の片末端（ $\omega$ -末端）または疎水性ブロック末端（ $\omega$ -末端）に重合可能なエチレン性不飽和二重結合を有しており、

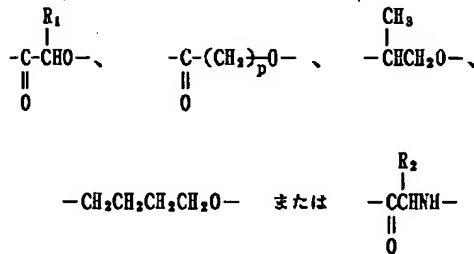
該エチレン性不飽和二重結合が、スチレン、低級アルキルメタクリレート、低級アルキルアクリレート、アクリロニトリル、メタクリロニトリル、ブタジエンおよびイソプレンからなる群より選ばれるモノマーとの付加重合を介して前記高分子ミセル内で固化されたコアを形成していることを特徴とする前記組成物。

【請求項2】  $\alpha$ -末端に抗体または抗原が共有結合する前の親-疎水性ブロックコポリマーが、一般式（I）：



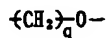
上式中、Aは官能基を表し、Bは、

## 【化2】



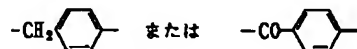
のユニットを表し、ここで $R_1$ は水素原子又は低級アルキル基であり、 $R_2$ は水素原子、メチル基、1-メチルエチル基、1-メチルプロピル、2-メチルプロピル、2-ベンジルオキシカルボニルエチル基またはベンジルオキシカルボニルメチル基であり、 $L_1$ は式

## 【化3】



（ここで、 $q$ は1～6の整数である）の連結基を表し、 $L_2$ は原子価結合または $-CH_2CH_2NH-$ の連結基の連結基を表し、 $L_3$ はカルボニル基、メチレン基、

## 【化4】



の基を表し、 $R$ は水素原子またはメチル基を表し、 $m$ は、10～20, 000の整数であり、そして $n$ は、0～10, 000の整数である、で表される、請求項1記

載の組成物。

【請求項3】 一般式（I）における $n$ が0である請求項2記載の組成物。

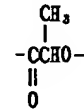
【請求項4】 一般式（I）における $n$ が10以上である請求項2記載の組成物。

【請求項5】 一般式（I）における、 $A-L_1-$ が【化5】



（ここで、 $r$ は2～5の整数である）を表し、 $L_2$ が原子価結合であり、 $B$ が

## 【化6】



を表し、そして $-L_3-CR=CH_2$ が

## 【化7】



である、請求項2または4記載の組成物。

【請求項6】 高分子ミセルの平均粒径が10～500 nmの範囲にある請求項1～5のいずれかに記載の組成物。

【請求項7】 高分子ミセルが、親水性ホモポリマーまたは親-疎水性ブロックコポリマーを適当量のスチレンに溶解した後、こうして得られる溶液を水性液中に分散させてO/W型エマルジョンを形成し、次いでブロックコポリマーの $\omega$ -末端の重合可能なエチレン性不飽和二重結合とスチレンとの間での付加重合を行って得られたものである請求項1～6のいずれかに記載の組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は生物学的試料中に存在する被検体を免疫複合体の形成を介して検出するためのイムノアッセイ用組成物に関する。

【0002】 本発明では、高分子ミセルおよび生物学的な特異的結合が利用される。

## 【0003】

【従来の技術】 例えば、血清学的診断に際し、間接凝集反応（または受動凝集反応）を利用して特異的抗体または特異的抗原を検出するために、抗体または抗原のキャリアーとして例えばベントナイト、ポリスチレンラテックスまたは赤血球もしくは細菌細胞等が使用されている。これらのうちポリスチレンラテックスは均一な大きさのポリスチレン粒子含有するラテックスを作成しやすく、粒子自体に抗原性がない等の理由で間接凝集反応に広く利用されている。このポリスチレンラテックスにおけるポリスチレン粒子はタンパク質等を強く吸着すると

いう点で抗原または抗体を固定するのに優れている。

【0004】しかし、ポリスチレン粒子のこのような吸着性は、一方では、試料中に存在する被検体以外の成分の非特異的吸着をもたらし、誤った結果を生じる可能性がある。また、上記のようなラテックス中の粒子の大きさは主として約0.5 $\mu$ mであるが、粒径が大きいことから測定系のバックグラウンドが高まる可能性もある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、生物学的試料中の被検体の検出に際し、上述の間接凝集反応系を初めとする各種測定系に利用でき、しかも、上記ポリスチレンラテックス等の使用に伴う短所が存在しないか、あるいは解消された検出手段を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、片末端もしくは両末端に官能基を有する親水性ホモポリマーまたは親-疎水性ブロックコポリマーの提供と、それらの特徴付けおよび応用について検討してきた。このようなポリマーのうち、親水性ホモポリマーの片末端（以下、 $\alpha$ -末端という）または親水性ブロック末端（以下、 $\alpha$ -末端ともいう）にタンパク質等を共有結合せしめうる官能基を有し、そしてもう一つの片末端（以下、 $\omega$ -末端という）または疎水性ブロック末端（以下、 $\omega$ -末端ともいう）に重合可能なエチレン性不飽和二重結合を有するポリマーを、モノマーとしても作用する疎水性モノマーに溶解した後、水性液中で乳化重合させることにより得られるコア-シェル型の安定化された高分子ミセル含有物が、上記の間接凝集反応を利用するイムノアッセイにおいて、ポリスチレンラテックスに都合よく代替できることが見出された。

【0007】したがって、本発明は、生物学的試料中に存在する抗原または抗体を検出することのできるイムノナノスフェアを含んでなるイムノアッセイ用組成物であって、イムノナノスフェアがコア-シェル型高分子ミセルであり、該高分子ミセルが親水性ホモポリマーまたは親-疎水性ブロックコポリマーに由来し、かつ、該ポリマーが片末端（ $\alpha$ -末端）または親水性ブロック末端（ $\alpha$ -末端）に共有結合した抗体または抗原を有し、そしてもう一方の片末端（ $\omega$ -末端）または疎水性ブロック末端（ $\omega$ -末端）に重合可能なエチレン性不飽和二重結合を有しており、該エチレン性不飽和二重結合がスチレン、低級アルキルメタクリレート、低級アルキルアクリレート、アクリロニトリル、メタクリロニトリル、ブタジエンおよびイソプレンからなる群より選ばれるモノマーとの付加重合を介して前記高分子ミセル内で固化されたコアを形成していることを特徴とする組成物を提供する。

【0008】

【本発明の好適な態様の説明】本発明にいう生物学的試

料とは、抗原または抗体のいずれか一方を含有する流体であれば、天然由来のものまたは人工的なもののいずれも包含される。天然由来のものとしては、血液、尿、汗、唾液、あるいはこれらの希釈的もしくは濃縮物等を挙げることができ、人工的なものとしては、動物もしくは微生物細胞の培養物、これらの細胞の破砕物、ペプチドもしくは核酸の合成混合物等を挙げることができる。このような生物学的試料は、必要により、適当な緩衝剤を使用して緩衝化した水性溶液であることができる。

【0009】本明細書において、低級アルキル基と称する場合は、炭素原子数1～6個の分枝していてもよいアルキル基を意味し、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、*iso*-プロピル、*n*-ブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、*n*-ペンチル、*n*-ヘキシルを挙げることができる。本発明においては、低級アルキル基がメチルである場合が好ましい。

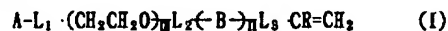
【0010】本発明で用いるポリマーにおいて、親水性ホモポリマーまたは親-疎水性ブロックコポリマーの親水性セグメントは、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドンまたはポリビニルアルコールのセグメントを含んでなるが、ポリエチレングリコールセグメントを含むものが好ましい。親-疎水性ブロックコポリマーにおける疎水性セグメントは、ポリプロピレングリコール、ポリテトラエチレンオキシド、ポリグリコリド、ポリラクチド、ポリラクトン類、ポリラクタム類、ポリ（ $\alpha$ -アミノ酸）類、ポリシロキサン、ポリ（低級アルキルメタクリレート）、ポリ（低級アルキルアクリレート）、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリブタジエン、ポリイソプレン等から構成することができる。

【0011】イムノナノスフェアを形成するための親水性ホモポリマーまたは親-疎水性ブロックコポリマーであって、いまだ、 $\alpha$ -末端に抗体または抗原が共有結合する前のポリマーとして好ましいものは、例えば、次の一般式（I）で表されるホモポリマーまたはブロックコポリマーを挙げることができる。

【0012】一般式（I）：

【0013】

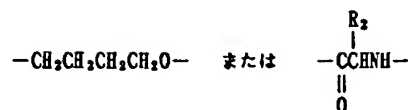
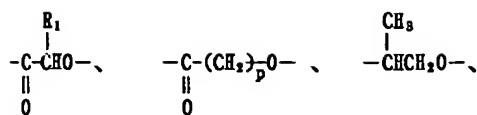
【化8】



【0014】上式中、Aは官能基を表し、Bは、

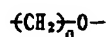
【0015】

【化9】



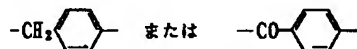
【0016】のユニットを表し、ここで $R_1$ は水素原子又は低級アルキル基であり、 $R_2$ は水素原子、メチル基、1-メチルエチル基、1-メチルプロピル、2-メチルプロピル、2-ベンジルオキシカルボニルエチル基またはベンジルオキシカルボニルメチル基であり、 $L_1$ は式

【0017】  
【化10】



【0018】(ここで、 $q$ は1~6の整数である)の連結基を表し、 $L_2$ は原子価結合または $-CH_2CH_2NH-$ の連結基の連結基を表し、 $L_3$ はカルボニル基、メチレン基、

【0019】  
【化11】



【0020】の基を表し、 $R$ は水素原子またはメチル基を表し、 $m$ は、10~20, 000の整数であり、そして $n$ は、0~10, 000の整数である。

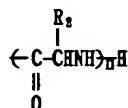
【0021】このようなホモポリマーまたはブロックコポリマーの、代表的なものは、一部を本発明者と共通する発明者等によって提案された、例えば、WO96/33233、WO96/32434、WO97/06203や、それらに記載されている

【0022】  
【化12】



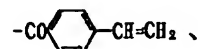
【0023】を得た後、必要により $-CH_2CH_2OH$ を $-CH_2CH_2NH_2$ に変換し、次いで必要により、プロピレンオキシド、テトラヒドロフラン、対応するラクチド、対応するラクトン等を用いる開環重合、あるいは、 $\alpha$ -アミノ酸誘導体のN-カルボン酸無水物を用いる二酸化炭素脱離重合法(所謂、NCA法)により得ることができる。例えば、後者では、

【0024】  
【化13】

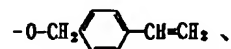


【0025】単位を伸長させた後、 $-L_3-CR=CH_2$ に対応する基、例えば、 $-COCH=CH_2$ 、 $-COC(CH_3)=CH_2$ 、

【0026】  
【化14】



【0027】 $-O-CH_2-CH=CH_2$ 、  
【0028】  
【化15】



【0029】等を導入し、 $\omega$ -末端を形成し、目的のホモポリマーまたはブロックコポリマーを得ることができる。上記、例えば、WO96/33233、WO96/32434、WO97/06203に記載されるのと同様に本発明で用いるホモポリマーまたはブロックコポリマーのAの官能基として多種多様な基、例えば、アルデヒド基( $-CHO$ )、アミノ基( $-NH_2$ )、メルカプト基( $-SH$ )、水酸基( $-OH$ )、カルボキシル基( $-COOH$ )を担持させることができる。

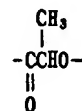
【0030】一般式(I)のホモポリマーまたはブロックコポリマーのうち、特に $A-L_1$ が

【0031】  
【化16】



【0032】(ここで、 $r$ は2~5の整数である。)を表し、 $L_2$ が原子価結合であり、Bが

【0033】  
【化17】



【0034】を表し、そして $-L_3-CR=CH_2$ が $-CO-C(CH_3)=CH_2$ または $-CO-CH=CH_2$ で表されるものが、本発明で都合よく用いることができる。

【0035】本発明では、このようなホモポリマーまたはブロックコポリマーを水混和性溶媒(例、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド)または水非混和性溶媒(例、塩化メチレン、クロロホルム、トルエン)に溶解し、水性液と混合処理するそれ自体公知の方法により高分子ミセルを形成し、その後、上記官能基を介して抗体または抗原を結合するか、あるいは高分子ミセルを形成する前に、予め、抗体または抗原を $\alpha$ -末端に共有結合しておき、そして高分子ミセルを形成してもよい。特に前者の方法が好ましいが、その場合には、官能基はブロックされた状態(例えば、官能基がアルデヒド基の場合には、アセタールもしくはケタールの状態)で高分子ミセルを形成し、抗体または抗原を結合させる直前に、

官能基を生じさせるのがよい。

【0036】上記の高分子ミセルを形成する際に、モノマーとして、例えば、スチレン、低級アルキルメタクリレート、低級アルキルアクリレート、アクリロニトリル、メタクリロニトリル、ブタジエンまたはイソプレンを共存させ、次いで重合させる。なお、これらのモノマーは、モノマーとすると同時に、唯一の有機溶媒として使用してもよく、こうして得られるホモポリマーまたはブロックコポリマーとモノマーとの溶液を水性液（必要により、緩衝化した、例えば、リン酸緩衝化生理食塩水）に分散させ、次いで重合させ、高分子ミセルの疎水性コアを固化して得ることのできる高分子ミセルが、本発明では、特に好ましく使用できる。上記重合反応は、上記で付加重合を生じるそれ自体公知の重合触媒または開始剤を用いて行う。

【0037】上記の高分子ミセルは、 $\omega$ -末端に重合可能なエチレン性不飽和二重結合を有するホモポリマーまたはブロックコポリマー（またはマクロマー）とモノマー（例、スチレン）の使用割合を選ぶことによって、高分子ミセルの粒径を調節することができる。

【0038】こうして得られる高分子ミセル（好ましくは粒径：10～500 nm、より好ましくは100～300 nm）を、例えば、上述の間接凝集反応を利用するイムノアッセイに用いると、既存のポリスチレンラテックスを用いる場合に比べて、有意にバックグラウンドを低下させることができる。

【0039】本発明の組成物では、一般的に、生物学的試料中に存在する被検体との特異的反応を介して形成される凝集物を光学濃度変化の測定値を、被検体の存在量の指標とできる。

【0040】

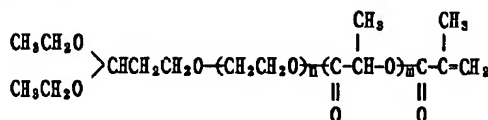
【実施例】以下、具体例によって、本発明をさらに詳述するが、本発明をこれらに限定することを意図するものでない。

【0041】製造例1：反応性ブロックコポリマーの合成

（ $\alpha$ -アセタールポリエチレングリコール/ $\omega$ -メタアクリロイルポリラクティックアシドの合成）

【0042】

【化18】



【0043】0.157 ml (1 mmol) の3,3-ジエトキシプロパノールと2.63 ml (1 mmol) のカリウムナフタレンを20 ml のテトラヒドロフラン (THF) 中に溶解した。約20分間撹拌して、カリウム、3,3-ジエトキシプロパノレート (PDP) を合成した。これに6 ml (120 mmol) のエチレノ

キシドを添加し、2日間室温で撹拌した。こうして分子量6000のポリエチレングリコール (PEG) を合成した。引き続き、34.69 (35 mmol) のラクチドのTHF溶液を添加して、室温で3h撹拌した。ラクチドを重合させ、その後、2.23 ml (15 mmol) の無水のメタクリル酸を加えて室温で2日間撹拌した。得られたブロックコポリマーを冷イソプロピルアルコール中に添加して沈殿させ、精製し、さらに凍結乾燥した。このときのポリラクチド (PLA) の分子量は約5000であった。こうして $\alpha$ -アセタールポリエチレングリコール/ $\omega$ -メタアクリロイルポリラクテックアシドを得た。

【0044】製造例2：高分子ミセルの調製

(1) 平均粒径70 nm

$\alpha$ -アセタールポリエチレングリコール/ $\omega$ -メタアクリロイルポリラクテックアシド ブロックコポリマー 0.2 g と 2,2'-アゾビスイソブチロニトリル (AIBN) 7.2 mg をスチレン 0.5 ml 中に溶解した。この液を15 ml のリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) 中に撹拌しつつ添加し、分散し、O/Wエマルションを作成した。撹拌は室温で20分間継続した。その後、減圧下で脱気を十分行い、エマルションの温度を60℃に上昇させ、24時間撹拌を継続した。これによってスチレンおよびアクリル基が重合してコアが固化した、ナノスフェアが得られた。この粒子を遠心分離によって集め (20000 rpm)、水で数回洗浄し、未反応のポリマーを除去した。この粒径を測定すると平均70 nmであった。

(2) 平均粒径110 nm

$\alpha$ -アセタールポリエチレングリコール/ $\omega$ -メタアクリロイルポリラクテックアシド ブロックコポリマー 0.2 g と AIBN 14.4 mg をスチレン 1.0 ml 中に溶解した。この液を15 ml のPBS中に撹拌しつつ添加し、分散し、O/Wエマルションを作成した。撹拌は室温で20分間継続した。その後、減圧下で脱気を十分行い、エマルションの温度を60℃に上昇させ、24時間撹拌を継続した。これによってスチレンおよびアクリル基が重合して内核が固化し、ナノスフェアが得られた。この粒子を遠心分離によって集め (20000 rpm)、水で数回洗浄し、未反応のポリマーを除去した。この粒径を測定すると平均110 nmであった。

【0045】製造例3：ナノスフェアの表面への抗体の結合

110 nm のナノスフェア懸濁液のpHを2.0に調整した。その後、この溶液を室温で5時間撹拌し、pHを7.0に最長製した。これによってアセタールは外れ、表面にアルデヒドが結合したイムノナノスフェアを得た。110 nm のイムノナノスフェア懸濁液 15  $\mu$ L (5 mg) と 2 ml のPBS溶液中と牛血清アル

ブミン (BSA) の抗体 0.4 ml (2.5 mg/ml) を混合し、37℃で2時間攪拌した。さらに、10 mgのNaCNBH<sub>3</sub>を添加し、室温で12時間保持した。その後、10 mgのNaCNBH<sub>3</sub>を再度添加し、12時間保持した。これによって抗体はナノスフェアの表面に結合した。これを冷所で保存した。

【0046】実施例：イムノナノスフェアとBSAとの結合

種々の濃度のBSA溶液を作製した (0.125、0.25、0.5、1.0 mg/ml)。この溶液の2~4 μL (pH 7.8) に47.6 μg/mlのイムノナノスフェアの1 mlを添加し、抗原-抗体反応を調べた。検出は340 nmの吸光度を測定した。結果を図1

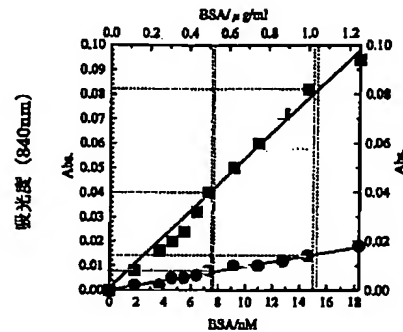
に示す。対照としてBSAに対する抗体溶液とBSA溶液との吸光度を示す。図1から明らかなように溶液同志の反応に比べて強い検出を示した。従来方法ではBSAとして10 nM以上でないと検出できず、これと比較して10倍以上の感度をもつことが確認された。

【0047】なお、110 nmのナノスフェアに代え、70 nmのナノスフェアを使用した場合、検出感度は110 nmの約1/10であった。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は実施例で得られた本発明の組成物を用いた場合の試料中の抗原 (BSA) の濃度に対応する340 nmの吸光度を表すグラフである。四角 (■) が本発明の測定結果であり、丸 (●) が対照である。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 片岡 一則

東京都中野区上鷺宮5-17-22